

METHOD FOR CELL CULTIVATION, CELL CULTIVATION DEVICE AND RECORDING MEDIUM

Publication number: JP2001275659 (A)

Publication date: 2001-10-09

Inventor(s): KINOOKA MASAHIRO; UMEGAKI RYOTA; TAYA MASAHIRO

Applicant(s): TAYA MASAHIRO; JAPAN TISSUE ENGINEERING KK

Classification:

- international: C12M1/34; C12M1/36; C12M3/00; C12M3/04; C12N5/02; C12N5/06; G06T1/00; C12R1/91; C12M1/34; C12M1/36; C12M3/00; C12M3/04; C12N5/02; C12N5/06; G06T1/00; (IPC1-7): C12M1/34; C12N5/02; C12M1/36; C12M3/00; C12M3/04; C12N5/06; G06T1/00; C12N5/02; C12R1/91; C12M1/36; C12R1/91; C12M3/00; C12R1/91

- European: C12M1/36; C12M3/04

Application number: JP20000099684 20000331

Priority number(s): JP20000099684 20000331

Also published as:

EP1270718 (A1)

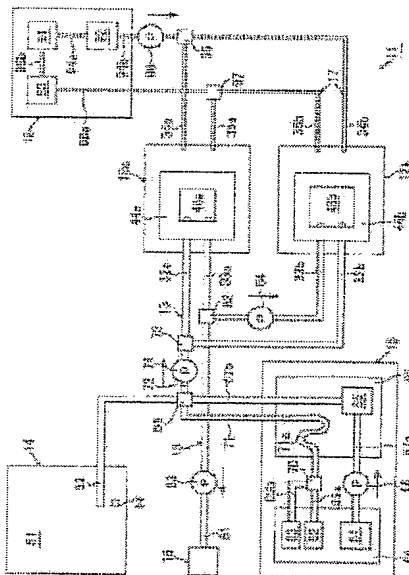
US2003054335 (A1)

WO0175070 (A1)

AU4462501 (A)

Abstract of JP 2001275659 (A)

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for cell cultivation, a cell cultivation device and a recording medium recording a cell cultivation program, which are easily applicable to culture operations while keeping conditions suitable for cell cultivation. **SOLUTION:** This cell cultivation device 11 comprises first and second cultivation units 12a and 12b, a cell feeding unit 14 connected to the cultivation units through liquid pipes 13, a liquid feeding unit 15 and a waste liquid tank 16, a gas-exchanging unit 18 connected to the cultivation units through gas pipes 17 and a control unit. CCD (charge coupled device) cameras are set in each cultivation unit, and image data of cells adhered to the bottom of a first cultivation space 46a or a second cultivation space 46b are thereby outputted to the control unit. The control unit calculates an adhered cell concentration based on the image data, determines timings for performing culture medium replacement and subculture operation and outputs execution-instructing signals to each part of the cell cultivation device 11 for execution.



Data supplied from the esp@cenet database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-275659

(P2001-275659A)

(43) 公開日 平成13年10月9日 (2001. 10. 9)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テマート* (参考)

C 1 2 N 5/02

C 1 2 N 5/02

4 B 0 2 9

C 1 2 M 1/36

C 1 2 M 1/36

4 B 0 6 5

3/00

3/00

A 5 B 0 5 7

3/04

3/04

Z

C 1 2 N 5/06

G 0 6 T 1/00

2 9 5

審査請求 未請求 請求項の数 7 O L (全 21 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号

特願2000-99684(P2000-99684)

(22) 出願日

平成12年3月31日 (2000. 3. 31)

(71) 出願人 300011759

田谷 正仁

大阪府豊中市宝山町10-5

(71) 出願人 399051858

株式会社 ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング

愛知県蒲郡市三谷北通6丁目209番地の1

(72) 発明者 紀ノ岡 正博

大阪府豊中市待兼山町1-12-3-3

(72) 発明者 梅垣 良太

大阪府豊中市上野西4-4-13

(74) 代理人 100068755

弁理士 恩田 博宣 (外1名)

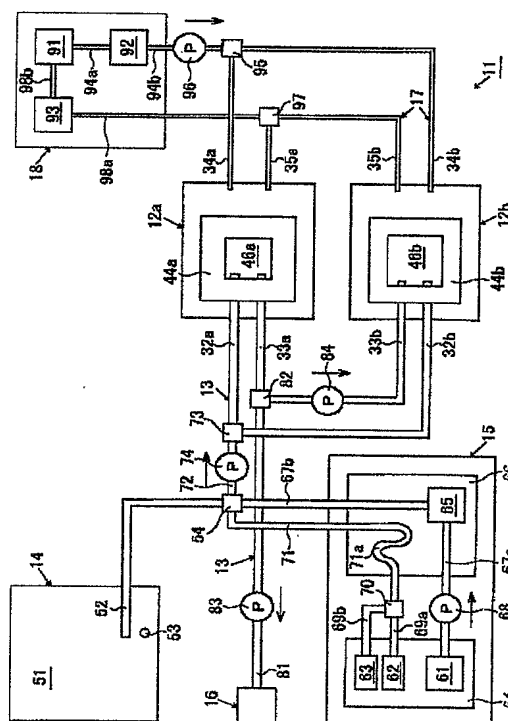
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 細胞培養方法、細胞培養装置及び記録媒体

(57) 【要約】

【課題】 細胞培養に適した条件を維持しつつ培養操作を容易に行える細胞培養方法、細胞培養装置、及び細胞培養プログラムを記録した記録媒体を提供する。

【解決手段】 細胞培養装置11は、第1及び第2培養ユニット12a、12bと、それらユニットに液体配管13を介して接続される細胞供給ユニット14、液体供給ユニット15及び廃液タンク16と、前記両培養ユニットに気体配管17を介して接続されるガス交換ユニット18と、制御装置とから構成されている。各培養ユニット内にはCCDカメラが設けられ、第1培養空間46a又は第2培養空間46bの底部に接着した細胞の画像データを制御装置に出力する。制御装置は前記画像データに基づいて接着細胞濃度を算出し、その算出結果に基づいて培地交換操作及び継代培養操作を実行するタイミングを決定し、その操作の実行を指示する出力信号を細胞培養装置11各部に出力して実行させる。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】 接着依存性細胞を培養容器内で培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも 1 種の操作を行いながら単層培養を行う細胞培養方法であって、画像入力手段により培養容器内の接着依存性細胞の画像データを制御手段に入力し、その画像データに基づいて制御手段により接着細胞数、接着細胞濃度、接着細胞占有面積又は接着細胞占有率を算出し、その算出結果に基づいて培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも 1 種の操作を実行するタイミングを決定し、その操作を実行することを特徴とする細胞培養方法。

【請求項 2】 前記継代培養操作を、培養容器内に細胞剥離剤を添加して培養容器の底面に接着した細胞を剥離させる細胞剥離工程と、前記細胞を剥離させる反応を停止させつつ細胞懸濁液を作製し、その細胞懸濁液を分配する細胞分配工程と、前記分配された細胞が培養容器の底面に接着した後に培地交換を行う接着後培地交換工程と、から構成し、前記算出結果に基づいて、前記制御手段により、前記接着後培地交換工程における接着細胞数、接着細胞濃度、接着細胞占有面積又は接着細胞占有率の増加率又は増加割合を計算し、その増加率又は増加割合が所定値未満になったところで培地交換操作を実行することを特徴とする請求項 1 に記載の細胞培養方法。

【請求項 3】 前記算出結果に基づいて、前記制御手段により、所定の培養時間における培地消費量を計算して累積培地消費量を求め、その累積培地消費量が所定量になるタイミングを決定し、培地交換操作を実行することを特徴とする請求項 1 又は請求項 2 に記載の細胞培養方法。

【請求項 4】 接着依存性細胞を培養容器内で培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも 1 種の操作を行いながら単層培養を行うための細胞培養装置であって、培養容器と、その培養容器内の接着依存性細胞の画像データを入力するための画像入力手段と、その画像データを処理するための制御手段と、その制御手段からの出力信号を出力するための出力手段と、から構成され、画像入力手段により培養容器内の接着依存性細胞の画像データを制御手段に入力し、その画像データに基づいて制御手段により接着細胞数、接着細胞濃度、接着細胞占有面積又は接着細胞占有率を算出し、その算出結果に基づいて培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも 1 種の操作を実行するタイミングを決定し、その操作の実行を指示する出力信号を出力手段に出力することを特徴とする細胞培養装置。

【請求項 5】 前記培養容器に培養可能面積の異なる複数の培養皿を設けるとともに、前記出力手段を、各培養皿に培地を供給するための培地供給手段と、各培養皿に細胞剥離剤を供給するための細胞剥離剤供給手段と、各

培養皿から液体を排出するための液体排出手段と、培養可能面積の小さい培養皿からその次に培養可能面積の大きい培養皿に細胞を移動させるための細胞移動手段と、から構成した請求項 4 に記載の細胞培養装置。

【請求項 6】 前記培養容器を横多角筒状に形成し、その培養容器の内側面に前記各培養皿を設けるとともに、前記各培養皿が設けられた培養容器の側面を培養容器の下端部に位置変更するための位置変更手段を設けた請求項 5 に記載の細胞培養装置。

10 【請求項 7】 接着依存性細胞を培養容器内で培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも 1 種の操作を行いながら単層培養を行うためのコンピュータ読み取り可能なプログラムを記録した記録媒体であって、前記プログラムは、画像入力手段により培養容器内の接着依存性細胞の画像データを入力するステップと、その画像データに基づいて接着細胞数、接着細胞濃度、接着細胞占有面積又は接着細胞占有率を算出するステップと、その算出結果に基づいて培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも 1 種の操作を実行するタイミングを決定するステップと、その操作の実行を指示するステップと、を備えた方法を実行する、記録媒体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】この発明は、接着依存性細胞を培養容器内で培養するための細胞培養方法、細胞培養装置、及び細胞培養プログラムを記録した記録媒体に関するものである。

【0002】

30 【従来の技術】従来より、接着依存性細胞をインビトロ (in vitro) で培養する際には、ほとんど全ての培養操作が手作業により行われるとともに、その操作を実行するタイミングも経験的に決定されていた。前記培養操作としては、主として、培養容器内の古い培地 (廃培地) を新しい培地に交換する際の培地交換操作と、培養容器内でコンフルエント状態 (培養容器の底面の大半が細胞によって単層に覆われている状態) になった細胞を複数の別の培養容器に分配して増殖させるための継代培養操作が挙げられる。

40 【0003】すなわち、前記培地交換操作は、経験的に培地中の成分のうち最も消費されやすい成分が完全に消費し尽くされるまでの期間よりも短い期間を区切って行われており、その成分の欠乏によって細胞の増殖速度等に悪影響が現れないことが前提であった。また、前記継代培養操作も同様に、経験的に細胞が培養容器内でコンフルエント状態になるまでの期間を推定し、その期間を区切って行われていた。そして、前記培地交換操作を行う際にはまず、新しい培地を 37℃ に加温した後、クリーンベンチ内で、細胞が接着している培養容器を適宜傾けながらピペットにて廃培地を抜き取り、前記 37℃ に

加温された新しい培地をピペットにて培養容器内に注入する。

【0004】一方、継代培養操作を行う際にはまず、クリーンベンチ内で、前記培養容器を適宜傾けながらピペットにて廃培地を除去した後、必要に応じて培養容器内のカルシウムイオン等を洗い流す。続いて、所定濃度のトリプシンを添加して細胞を培養容器の底面から剥離させた後、トリプシンインヒビターを添加して前記トリプシンによる細胞剥離反応を停止させる。次に、トリプシン、トリプシンインヒビター及び剥離された細胞を含む細胞懸濁液をピペットにて遠心チューブ内に移動させた後、遠心分離機を用いて1000r.p.m.程度の低い回転速度で細胞のみを沈澱させる。最後に、トリプシン及びトリプシンインヒビターを含む上清を除去した後、新しい培地を注入して細胞を再懸濁し、複数の培養容器に分配する。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】ところが、前記従来の細胞培養方法では、ほとんど全ての培養操作が手作業で行われていたことから、培養操作が非常に煩雑であった。さらに、培地交換操作や継代培養操作を実行するタイミングの決定が経験的に行われていたことから、そのタイミング自体が非常に大雑把なものとなってしまう、現状に即した的確なものではあり得なかった。特に、対象となる細胞自体が予測不可能な要素を多分に含むことから、経験に基づいた細胞培養条件の決定のみでは不十分であると言える。

【0006】この発明は、上記のような従来技術に存在する問題点に着目してなされたものである。その目的とするところは、細胞培養に適した条件を維持しつつ、培養操作を容易に行うことができる細胞培養方法、細胞培養装置、及び細胞培養プログラムを記録した記録媒体を提供することにある。

【0007】

【課題を解決するための手段】上記の目的を達成するために、請求項1に記載の発明の細胞培養方法は、接着依存性細胞を培養容器内で培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも1種の操作を行いながら単層培養を行う細胞培養方法であって、画像入力手段により培養容器内の接着依存性細胞の画像データを制御手段に入力し、その画像データに基づいて制御手段により接着細胞数、接着細胞濃度、接着細胞占有面積又は接着細胞占有率を算出し、その算出結果に基づいて培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも1種の操作を実行するタイミングを決定し、その操作を実行することを特徴とするものである。

【0008】請求項2に記載の発明の細胞培養方法は、請求項1に記載の発明において、前記継代培養操作を、培養容器内に細胞剥離剤を添加して培養容器の底面に接着した細胞を剥離させる細胞剥離工程と、前記細胞を剥

離させる反応を停止させつつ細胞懸濁液を作製し、その細胞懸濁液を分配する細胞分配工程と、前記分配された細胞が培養容器の底面に接着した後に培地交換を行う接着後培地交換工程と、から構成し、前記算出結果に基づいて、前記制御手段により、前記接着後培地交換工程における接着細胞数、接着細胞濃度、接着細胞占有面積又は接着細胞占有率の増加率又は増加割合を計算し、その増加率又は増加割合が所定値未満になったところで培地交換操作を実行することを特徴とするものである。

10 【0009】請求項3に記載の発明の細胞培養方法は、請求項1又は請求項2に記載の発明において、前記算出結果に基づいて、前記制御手段により、所定の培養時間における培地消費量を計算して累積培地消費量を求め、その累積培地消費量が所定量になるタイミングを決定し、培地交換操作を実行することを特徴とするものである。

20 【0010】請求項4に記載の発明の細胞培養装置は、接着依存性細胞を培養容器内で培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも1種の操作を行いながら単層培養を行うための細胞培養装置であって、培養容器と、その培養容器内の接着依存性細胞の画像データを入力するための画像入力手段と、その画像データを処理するための制御手段と、その制御手段からの出力信号を出力するための出力手段と、から構成され、画像入力手段により培養容器内の接着依存性細胞の画像データを制御手段に入力し、その画像データに基づいて制御手段により接着細胞数、接着細胞濃度、接着細胞占有面積又は接着細胞占有率を算出し、その算出結果に基づいて培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも1種の操作を実行するタイミングを決定し、その操作の実行を指示する出力信号を出力手段に出力することを特徴とするものである。

30 【0011】請求項5に記載の発明の細胞培養装置は、請求項4に記載の発明において、前記培養容器に培養可能面積の異なる複数の培養皿を設けるとともに、前記出力手段を、各培養皿に培地を供給するための培地供給手段と、各培養皿に細胞剥離剤を供給するための細胞剥離剤供給手段と、各培養皿から液体を排出するための液体排出手段と、培養可能面積の小さい培養皿からその次に培養可能面積の大きい培養皿に細胞を移動させるための細胞移動手段と、から構成したものである。

40 【0012】請求項6に記載の発明の細胞培養装置は、請求項5に記載の発明において、前記培養容器を横多角筒状に形成し、その培養容器の内側面に前記各培養皿を設けるとともに、前記各培養皿が設けられた培養容器の側面を培養容器の下端部に位置変更するための位置変更手段を設けたものである。

50 【0013】請求項7に記載の発明の記録媒体は、接着依存性細胞を培養容器内で培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも1種の操作を行いながら単層

培養を行うためのコンピュータ読み取り可能なプログラムを記録した記録媒体であって、前記プログラムは、画像入力手段により培養容器内の接着依存性細胞の画像データを入力するステップと、その画像データに基づいて接着細胞数、接着細胞濃度、接着細胞占有面積又は接着細胞占有率を算出するステップと、その算出結果に基づいて培地交換操作及び継代培養操作から選ばれる少なくとも1種の操作を実行するタイミングを決定するステップと、その操作の実行を指示するステップと、を備えた方法を実行する、ものである。

【0014】

【発明の実施の形態】（第1実施形態）以下、この発明の第1実施形態を図面に基づいて詳細に説明する。

【0015】図1に模式的に示すように、細胞培養装置11は、第1培養ユニット12a及び第2培養ユニット12bと、それらユニット12a、12bに液体配管13を介して接続される細胞供給ユニット14、液体供給ユニット15及び廃液タンク16と、培養ユニット12a、12bに気体配管17を介して接続されるガス交換ユニット18と、図示しない制御装置とから構成されている。前記第1培養ユニット12aと第2培養ユニット12bとはほぼ同様な構造を有している。

【0016】図2及び図3に示すように、第1及び第2培養ユニット12a、12bの下端部には、有底四角箱状に形成されたステージ台21が設けられている。各ステージ台21の中央部には、画像入力手段としてのCCD（電荷結合素子）カメラ22がレンズ22aを上方向に向けて配設されている。

【0017】ステージ台21の上部開口部には、ガラス板やアクリル板等の透明板により四角板状に形成された傾斜手段を構成する傾斜ステージ23が設けられ、ステージ台21の一側部上端縁に対しヒンジ部24を介して回動可能に蝶着されている。この傾斜ステージ23の基端部には、上下動可能な回動棒25aを備えた傾斜手段を構成する回動装置25が設けられ、回動棒25aを上下動させて傾斜ステージ23を所定角度回動させることができるようになっている。また、この傾斜ステージ23の上面には、透明な材料により四角板状に形成された保温プレート26が載置され、その上面が所定温度（例えば37℃）に保温されるようになっている。

【0018】この保温プレート26の上面には、透明な合成樹脂により四角箱状に形成された培養容器31が載置されている。この培養容器31のヒンジ部24側の側面である開口面31aは、培養容器31に対して開閉可能に嵌合され、培養容器31が開口又は密閉されるようになっている。また、培養容器31の前後両内側面下端部には、横方向に延びる係合凸部31bが突設されている。

【0019】第1培養ユニット12aの開口面31aの下端部には、第1液体供給配管32a及び第1液体排出

配管33aが接続されている。さらに、これら配管32a、33aの上方には、第1ガス供給配管34a及び第1ガス排出配管35aが接続されている。一方、第2培養ユニット12bの開口面31aの下端部には、第2液体供給配管32b及び第2液体排出配管33bが接続されている。さらに、これら配管32b、33bの上方には、第2ガス供給配管34b及び第2ガス排出配管35bが接続されている。また、これら培養容器31の上方には、図示しない照明装置が配設され、培養容器31の底部を照明するようになっている。

【0020】図3及び図4(a)、(b)に示すよう

に、第1培養ユニット12aの培養容器31の底面上には第1培養皿41aが載置されている。この第1培養皿41aは、プレート42、親水性フィルム43、第1樹脂堰44a及びクリップ45から構成されている。

【0021】前記プレート42は、ポリカーボネート等の透明な合成樹脂により四角板状に形成されている。このプレート42の下面両側部には、前後方向に延びる左右一対の四角溝42aが穿設されている。このプレート42の上面には、透明な親水性樹脂により四角形状に形成された親水性フィルム43が載置されている。さらに、この親水性フィルム43上には、シリコーン樹脂等の疎水性樹脂により四角枠状に形成された第1樹脂堰44aが載置され、この第1樹脂堰44aに取り囲まれた親水性フィルム43上の第1培養空間46a内で、接着依存性細胞が培養されるようになっている。また、この第1樹脂堰44aの一側部には、前記第1液体供給配管32a及び第1液体排出配管33aが挿通されている。

【0022】図4(b)に示すように、前記プレート42、親水性フィルム43及び第1樹脂堰44aを挟持固定するためのクリップ45は、ほぼ長四角枠状に形成された四角枠45aと、その四角枠45a内で上下動可能に配設された長四角板状の押圧板45bと、その押圧板45bを押圧するための押圧ネジ45cとから構成されている。このクリップ45は、四角枠45aの下端部を前記プレート42の四角溝42a内に係入させた状態で押圧ネジ45cを螺進させることによって、押圧板45bを下動させて第1樹脂堰44aの上面を押圧するようになっている。また、前記四角枠45aの下端部には、前記培養容器31内の係合凸部31bと係合するための係止突部45dが突設されている。

【0023】一方、第2培養ユニット12bを構成する培養容器31の底面上には第2培養皿41bが載置されている。図5に示すように、この第2培養皿41bにおいて、第2樹脂堰44bは、前記第1培養ユニット12aを構成する第1樹脂堰44aの第1培養空間46aよりも広い第2培養空間46bが形成されている。また、この第2樹脂堰44bの一側部には、前記第2液体供給配管32b及び第2液体排出配管33bが挿通されている。それ以外の構成は上記第1培養ユニット12aと同

10

20

30

40

50

様である。

【0024】図1に模式的に示すように、細胞供給手段を構成する細胞供給ユニット14は、略示されるクリーンベンチ51と、そのクリーンベンチ51内に配設された細胞供給配管52と、その細胞供給配管52の先端部付近に設けられた供給スイッチ53とから構成されている。前記細胞供給配管52の一端はクリーンベンチ51内に配設され、他端は第1電動バルブ54に接続されている。

【0025】培地供給手段及び細胞剥離剤供給手段を構成する液体供給ユニット15は、貯蔵培地タンク61、剥離剤タンク62及び剥離停止剤タンク63を収容した簡易冷蔵庫64と、加温培地タンク65を収容した保温庫66とから構成されている。貯蔵培地タンク61、剥離剤タンク62及び剥離停止剤タンク63はそれぞれ、約5℃の温度に保冷された簡易冷蔵庫64内に配設され、培地47、トリプシン等の細胞剥離剤及びトリプシンインヒビター等の剥離停止剤を低温で貯蔵している。加温培地タンク65は約37℃の温度に保温された保温庫66内に配設され、培地47をその温度で保温している。この加温培地タンク65には図示しない培地残量センサが設けられている。

【0026】前記貯蔵培地タンク61及び加温培地タンク65は、第1培地供給配管67aにより接続されている。この第1培地供給配管67aの途中には培地供給ポンプ68が設けられている。前記加温培地タンク65には第2培地供給配管67bが接続されている。この第2培地供給配管67bは前記第1電動バルブ54に接続されている。一方、前記剥離剤タンク62及び剥離停止剤タンク63はそれぞれ、剥離剤配管69a及び剥離停止剤配管69bと接続されている。これら配管69a、69bは第2電動バルブ70に接続されている。この第2電動バルブ70は継代培養配管71と接続されている。この継代培養配管71の途中には表面積が大きくなるように形成されるとともに保温庫66内に配設された加温部71aが設けられ、そこを通過する際に液体が加温されるようになっている。また、この継代培養配管71は前記第1電動バルブ54と接続されている。

【0027】第1電動バルブ54は液体供給配管72と接続されている。この液体供給配管72は第3電動バルブ73と接続されるとともに、その途中には液体供給ポンプ74が設けられている。さらに、この第3電動バルブ73は前記第1及び第2液体供給配管32a、32bと接続されている。

【0028】廃液タンク16は培養容器31内から排出される液体を一時的に収容するために設けられ、液体排出配管81と接続されている。この液体排出配管81は第4電動バルブ82に接続されるとともに、その途中には液体排出ポンプ83が設けられている。さらに、この第4電動バルブ82は前記第1及び第2液体排出配管3

3a、33bと接続されている。これらにより液体排出手段が構成されている。一方、前記第2液体排出配管33bの途中には、細胞移動手段を構成する細胞移動ポンプ84が設けられ、第1培養ユニット12a内の細胞懸濁液を第2培養ユニット12bへと移動させることができる。

【0029】ガス交換ユニット18はガス供給器91、加湿器92及びガスアナライザ93から構成されている。前記ガス供給器91は、図示しない炭酸ガスポンプ及び酸素ポンプから無菌状態の炭酸ガス及び酸素ガスを供給することができるとともに、図示しないフィルタを通して取り込まれる無菌状態の空気を供給及び排気して換気機能を発揮することができるようになっている。加湿器92は水蒸気を発生させて湿気を付与することができるようになっている。

【0030】これらガス供給器91及び加湿器92は第1気体供給配管94aによって接続されている。さらに、前記加湿器92には第2気体供給配管94bが接続されている。この第2気体供給配管94bは、第5電動バルブ95と接続されるとともに、その途中にはガス循環ポンプ96が設けられている。この第5電動バルブ95は前記第1及び第2ガス供給配管34a、34bと接続されている。一方、前記第1及び第2ガス排出配管35a、35bは第6電動バルブ97と接続されている。この第6電動バルブ97は第1ガス循環配管98aと接続されている。

【0031】この第1ガス循環配管98aはガスアナライザ93と接続されている。このガスアナライザ93は、第1培養ユニット12a又は第2培養ユニット12bの培養容器31内から排出されるガスの成分分析を行って、その成分分析データ（炭酸ガス濃度データ、酸素濃度データ及び湿度データ）を制御装置へと出力する。さらに、このガスアナライザ93は第2ガス循環配管98bと接続されている。この第2ガス循環配管98bはガス供給器91と接続されている。そして、前記ガスアナライザ93で成分分析が終了したガスの一部は、ガス供給器91に送り込まれて循環し、再利用されるようになっている。

【0032】図6に示すように、制御手段としての制御装置101は、CPU、ROM、RAM、データファイル102、キーボード103、出力手段を構成するモニタ104、画像処理手段としての画像処理装置105及び計時装置106を備えている。ROMはCPUが実行する細胞培養装置11の制御プログラムを記憶している。CPUはROMに記憶された制御プログラムに従って、画像照合処理等の種々の演算処理を実行する。RAMはCPUが実行した演算処理結果を一時的に保存する。

【0033】データファイル102は、あらかじめ所定の画像データとしての接着依存性細胞の細胞パターンデ

ータを記憶するとともに、培地残量センサ65a及びガスアナライザ93における各閾値データ等を記憶している。そして、CPUは前記細胞パターンデータとCCDカメラ22にて撮影された画像データとの照合を行って、画像データ内の接着細胞濃度を算出する。また、前記閾値データと、培地残量センサ65aから入力される培地残量データ、又はガスアナライザ93から入力される炭酸ガス濃度データ、酸素濃度データ若しくは湿度データとが一致するか否かを判別する。

【0034】キーボード103は前記制御プログラムの開始信号、停止信号、修正信号等をCPUに出力する。モニタ104はCPUから出力される細胞培養装置11各部の種々の動作環境データを表示するとともに、CCDカメラ22にて撮影された画像データを画面表示する。また、CPUは第1及び第2培養ユニット12a、12b内に配設されたCCDカメラ22に切替信号を出力し、第1培養ユニット12a又は第2培養ユニット12b内のCCDカメラ22からの画像データの出力を切替える。

【0035】画像処理装置105は正規化処理や特徴抽出処理等を行い、CCDカメラ22にて撮影された画像データ内において、特徴抽出された部分領域データを切り出してCPUに出力する。すなわち、CPUはCCDカメラ22にて撮影された画像データの部分領域データを画像処理装置105を介して取り込む。

【0036】CPUは供給スイッチ53から入力信号が入力されたとき、第1及び第3電動バルブ54、73に切替信号を出力し、細胞供給配管52、液体供給配管72及び第1液体供給配管32aを連通させる。さらに、このCPUは前記供給スイッチ53が押圧されている間、液体供給ポンプ74に駆動信号を出力して細胞供給配管52の先端から第1培養空間46aへと細胞懸濁液を移動させる。また、CPUは前記供給スイッチ53があらかじめ設定された限界時間を越えて押圧された場合には、前記駆動信号の出力をオフして液体供給ポンプ74の駆動を停止させる。計時装置106は供給スイッチ53からの入力信号の入力により培養時間の計時を開始し、その培養時間データをCPUに出力する。

【0037】培地残量センサ65aは加温培地タンク65内の培地47残量を計測した培地残量データをCPUに出力する。そして、CPUは前記培地残量データがあらかじめ設定された加温培地量範囲内であるか否かを判別する。このとき、培地残量データが加温培地量範囲よりも低い場合には、CPUは培地供給ポンプ68に駆動信号を出力して貯蔵培地タンク61から加温培地タンク65へと培地47を移動させる。前記培地残量データが加温培地量範囲よりも高くなった場合には、CPUは前記駆動信号の出力をオフして培地供給ポンプ68の駆動を停止させる。

【0038】ガスアナライザ93は第1ガス循環配管9

8aから送られるガスの成分分析を行って、そのガスに含まれる炭酸ガス濃度データ、酸素濃度データ及び湿度データをCPUに出力する。そして、CPUは前記炭酸ガス濃度データがあらかじめ設定された炭酸ガス濃度範囲（例えば5～10%前後）内であるか否かを判別するとともに、前記酸素濃度データがあらかじめ設定された酸素ガス濃度範囲（例えば15～25%前後）内であるか否かを判別する。さらに、CPUは前記湿度データがあらかじめ設定された湿度範囲内であるか否かを判別する。

【0039】このとき、前記炭酸ガス濃度データが炭酸ガス濃度範囲よりも低い場合には、CPUはガス供給器91に炭酸ガス供給信号を出力して炭酸ガスを供給させ、逆に高い場合には、CPUは前記炭酸ガス供給信号の出力をオフして炭酸ガスの供給を停止させる。また、前記酸素濃度データが酸素ガス濃度範囲よりも低い場合には、CPUはガス供給器91に酸素ガス供給信号を出力して酸素ガスを供給させ、逆に高い場合には、CPUは前記酸素ガス供給信号の出力をオフして酸素ガスの供給を停止させる。一方、前記湿度データが湿度範囲よりも低い場合には、CPUは加湿器92に加湿信号を出力して水蒸気を供給させ、逆に高い場合には、CPUは前記加湿信号の出力をオフして水蒸気の供給を停止させる。

【0040】一方、CPUは回動装置25に所定時間上動信号を出力し、回動棒25aを上動させて傾斜ステージ23を所定角度傾斜させる。また、CPUは回動装置25に下動信号を出力し、回動棒25aを下動させて傾斜ステージ23を水平状態に戻す。CPUは前記CCDカメラ22に出力した切替信号と同調して、第1培養ユニット12a又は第2培養ユニット12b内の保温プレート26及び照明装置107に切替信号を出力し、それらの電源のオン/オフを同時に切替える。

【0041】CPUは第2電動バルブ70に切替信号を出力し、剥離剤配管69a又は剥離停止剤配管69bと、継代培養配管71とを連通させる。CPUは第4電動バルブ82に切替信号を出力し、液体排出配管81及び第1液体排出配管33a、液体排出配管81及び第2液体排出配管33b、又は第1液体排出配管33a及び第2液体排出配管33bを連通させる。CPUは液体排出ポンプ83に駆動信号を出力し、培養容器31内の液体を液体排出配管81を通して廃液タンク16内へと排出させる。CPUは細胞移動ポンプ84に駆動信号を出力し、第1培養空間46a内の細胞懸濁液を第2培養空間46bへと移動させる。

【0042】CPUは、前記CCDカメラ22に出力した切替信号と同調して、第5及び第6電動バルブ95、97に切替信号を同時に出力する。そして、第2気体供給配管94b、第1ガス供給配管34a、第1ガス排出配管35a及び第1ガス循環配管98aを同時に連通さ

10

20

30

40

50

せるとともに、第2気体供給配管94b、第2ガス供給配管34b、第2ガス排出配管35b及び第1ガス循環配管98aを同時に連通させる。

【0043】上記細胞培養装置11の作用について以下に記載する。上記細胞培養装置11を用いて細胞を培養する際にはまず、第1及び第2培養ユニット12a、12b内に配設される培養容器31を無菌的に組み立てる。すなわち、図2及び図3に示すように、各開口面31aの所定位置に液体供給配管32a、32b、液体排出配管33a、33b、ガス供給配管34a、34b及びガス排出配管35a、35bを挿通させる。次に、図4(a)及び図5に示すように、第1及び第2樹脂堰44a、44bの一側部所定位置に、前記液体供給配管32a、32b及び液体排出配管33a、33bを挿通させる。

【0044】次に、第1及び第2培養皿41a、41bを組み立てる。すなわち、各プレート42の上面に親水性フィルム43を積層した後、第1樹脂堰44a又は第2樹脂堰44bを積み上げる。続いて、図4(b)に示されるクリップ45の下端部を各四角溝42aに係入させた後、押圧ネジ45cを螺進させて各押圧板45bの下面で第1樹脂堰44a又は第2樹脂堰44bの上面を押圧し、第1及び第2培養空間46a、46bの下端部から培地47が漏出しないように挟持固定する。

【0045】最後に、これら第1及び第2培養皿41a、41bを各培養容器31の底面上に載置し、各係止突部45dに係合凸部31bに係合させながら開口面31aで各培養容器31を密閉する。続いて、組み立てられた各培養容器31を保温プレート26の上面中央部に載置した後、貯蔵培地タンク61、剥離剤タンク62、剥離停止剤タンク63、ガス供給器91の炭酸ガスポンベ、酸素ガスポンベ及び加湿器92内に、それぞれ充分量の培地47、細胞剥離剤、剥離停止剤、炭酸ガス、酸素ガス及び水を充填し、キーボード103からCPUに開始信号を入力する。

【0046】前記開始信号により、CPUはまず、図7に示されるステップS1（以下、S1とのみ記載する。その他のステップについても同様である）において細胞培養装置11各部の動作環境確認を行う。すなわち、CPUは簡易冷蔵庫64、保温庫66、ガスアナライザ93、ガス循環ポンプ96及び培地残量センサ65aの電源をオンにするとともに、第1培養ユニット12a内のCCDカメラ22、保温プレート26及び照明装置107の電源をオンにする。

【0047】すると、第1培養ユニット12a内の照明装置107が第1培養皿41aを照明し、CCDカメラ22が第1培養空間46a内の映像を撮影してその映像をモニタ104に映し出す。また、CPUは細胞培養装置11各部の動作環境データをモニタ104の画面上に表示する。このとき、CPUは培地残量センサ65aか

ら入力される培地残量データに基づいて培地供給ポンプ68を駆動させ、加温培地タンク65に所定量の培地47を移動させる。

【0048】一方、CPUは第5及び第6電動バルブ95、97に切替信号を出力し、第2気体供給配管94b、第1ガス供給配管34a、第1ガス排出配管35a及び第1ガス循環配管98aを連通させ、ガスを第1培養ユニット12aの培養容器31内へと供給させる。このとき、CPUはガスアナライザ93から入力される成分分析データに基づいてガス供給器91及び加湿器92にガスの成分調整を行わせる。上記細胞培養装置11の準備が完了したところで、CPUはモニタ104に動作環境データとしての準備完了信号を出力してモニタ104の画面上に準備完了表示させる。

【0049】次に、CPUはS2において細胞の接種を行う。すなわち、クリーンベンチ51内で手作業により接着依存性細胞の細胞懸濁液を調製した後、その懸濁液に細胞供給配管52の先端を挿入した状態で供給スイッチ53を押圧する。このとき、CPUは第1、第3及び第4電動バルブ54、73、82に切替信号を出力し、細胞供給配管52、液体供給配管72及び第1液体供給配管32aを連通させるとともに、第4電動バルブ82を閉鎖させる。そして、CPUは前記供給スイッチ53が押圧されている間中、液体供給ポンプ74を駆動させて前記細胞懸濁液を第1培養ユニット12aの第1培養空間46a内に移動させる。

【0050】次に、制御装置101はS3において部分領域データの取り込みを行う。すなわち、制御装置101はCCDカメラ22にて撮影された第1培養皿41aの底面に接着している細胞の画像を画像データとして画像処理装置105に取り込む。続いて、この画像処理装置105は前記画像データの特徴抽出処理を行って部分領域データを切り取り、CPUに出力する。続いて、CPUはS4において前記部分領域データとデータファイル102に記憶されている細胞パターンデータとを照合する。そして、CPUはS5において前記部分領域データと細胞パターンデータとが一致するか否かを判断し、一致しない場合には前記S3の処理を繰り返し、一致した場合にはS6の処理を行う。このS6において、CPUは前記部分領域データに基づいて第1培養空間46aの底部に接着している接着依存性細胞の細胞密度（接着細胞濃度）を算出してRAMに記憶させる。

【0051】次に、CPUはS7において、前記接着細胞濃度と、その処理以前に記憶された最も新しい接着細胞濃度（前回算出結果）との差（増加率又は増加割合）を計算する。なお、前記前回算出結果がRAMに記憶されていなかった場合には、その接着細胞濃度を0として処理する。そして、このS7において前記増加率又は増加割合がROMに記憶された設定値（所定値）以上である場合には、CPUはS8の処理を行って所定時間待機

した後に S 3 の処理を繰り返す。逆に前記増加率又は増割割合が所定値未満であった場合には、CPU は S 9 において接着後培地交換工程における培地交換操作を行う。なお、前記所定値としては、好ましくは 0 又はほぼ 0 の値である。

【0052】この S 9 において、CPU はまず、第 4 電動バルブ 8 2 に切替信号を出力し、第 1 液体排出配管 3 3 a と液体排出配管 8 1 とを連通させる。次に、CPU は液体排出ポンプ 8 3 を駆動させて第 1 培養空間 4 6 a 内の廃培地 4 7 を廃液タンク 1 6 へと排出させながら、
10 回動装置 2 5 の回動棒 2 5 a をゆっくりと上動させる。このとき、図 3 に示されるように、傾斜ステージ 2 3 は回動棒 2 5 a の上動に伴って所定量回動されながら培養容器 3 1 を傾斜させ、第 1 液体排出配管 3 3 a による廃培地 4 7 の排出を容易にさせる。この状態で、液体排出ポンプ 8 3 は第 1 培養空間 4 6 a 内の廃培地 4 7 及び親水性フィルム 4 3 に接着されなかった接着不能細胞を第 1 液体排出配管 3 3 a の先端から汲み出す。そして、第 1 培養空間 4 6 a 内には親水性フィルム 4 3 の上面に接着した細胞のみが残留する。

【0053】前記液体排出ポンプ 8 3 に対する駆動信号がオフしたところで、CPU は第 4 電動バルブ 8 2 を閉鎖させる。続いて、CPU は回動装置 2 5 の回動棒 2 5 a を下動させて傾斜ステージ 2 3 を水平状態に戻す。次に、CPU は第 1 及び第 3 電動バルブ 5 4、7 3 に切替信号を出力し、第 2 培地供給配管 6 7 b、液体供給配管 7 2 及び第 1 液体供給配管 3 2 a を連通させる。さらに、CPU は液体供給ポンプ 7 4 を駆動させて加温培地
20 タンク 6 5 内の加温培地 4 7 を第 1 培養空間 4 6 a 内に供給させる。そして、前記液体供給ポンプ 7 4 の駆動が停止したところで、CPU は第 1 及び第 3 電動バルブ 5 4、7 3 を閉鎖させる。

【0054】次に、CPU は S 1 0 の処理を行って所定時間待機した後、図 8 に示される S 1 1 ~ S 1 4 の処理を行う。この S 1 1 ~ S 1 4 は上記 S 3 ~ S 6 と同様の処理である。そして、S 1 5 において、CPU は前記 S 1 4 において RAM に記憶された接着細胞濃度がデータファイル 1 0 2 に記憶された設定値（限界値）未満である場合には S 1 6 の処理を行い、前記接着細胞濃度が限界値以上である場合には S 1 7 の処理を行う。なお、前記限界値としては例えば、ほぼコンフルエント状態の接着細胞濃度である。

【0055】S 1 6 において、CPU は前記 S 1 4 で記憶された接着細胞濃度及び前回算出結果を用いて、所定時間に第 1 培養空間 4 6 a 内の接着依存性細胞が消費した培地消費量と、現在の培地 4 7 の状態を示す累積培地消費量とを計算する。すなわち、CPU はまず、データファイル 1 0 2 に記憶された接着依存性細胞の単位時間当たりの培地消費速度を読み出す。この培地消費速度としては、好ましくは培地 4 7 中の成分のうち最も消費さ

れやすい成分について、あらかじめ実験により求められたものである。次に、CPU は前記 S 1 4 で記憶された接着細胞濃度と前回算出結果との間の平均濃度を計算するとともに、前回算出結果を算出した時刻（培養時間）から現在に至るまでの経過時間を計算する。そして、CPU は前記培地消費速度に平均濃度及び経過時間を乗じることによって、前記経過時間内に消費された培地消費量を計算する。さらに、CPU は前記培地消費量を RAM に記憶させるとともに、前回培地交換を行ってから現在に至るまでに RAM に記憶された培地消費量の累積値（累積培地消費量）を計算する。

【0056】そして、CPU は S 1 8 において前記累積培地消費量がデータファイル 1 0 2 に記憶された所定量未満であるか否かを判別する。前記累積培地消費量が所定量未満であった場合には、CPU は S 1 9 の処理を行って所定時間待機した後 S 1 1 の処理を繰り返す。逆に累積培地消費量が所定量以上であった場合には、CPU は S 2 0 において上記 S 9 と同様に培地交換操作を行った後に S 1 9 の処理を行う。なお、前記所定量としては、第 1 培養空間 4 6 a 内の培地 4 7 量に基づく前記培地 4 7 中の成分量よりも少ない量であり、好ましくはその成分量とほぼ同じ量である。

【0057】一方、S 1 5 において接着細胞濃度が限界値以上であった場合には、CPU は S 1 7 において、現在第 1 培養ユニット 1 2 a 又は第 2 培養ユニット 1 2 b のいずれから入力が行われているかを判断して継代培養操作が可能であるか否かを判別する。そして、CPU は継代培養操作が可能である（現在第 1 培養ユニット 1 2 a から入力されている）場合には S 2 1 で継代培養操作を行い、不可能である（現在第 2 培養ユニット 1 2 b から入力されている）場合には S 2 2 の処理を行った後に S 1 9 の処理を行う。

【0058】この S 2 2 において、CPU はモニタ 1 0 4 に単層培養操作の終了を画面表示させる。なお、この画面表示はキーボード 1 0 3 から CPU に対し停止信号又は修正信号が入力されるまで継続される。そして、CPU は前記停止信号が入力された場合には全ての処理を停止して電源をオフし、修正信号が入力された場合にはその指示に従う。

【0059】また、前記 S 2 1 において継代培養操作を行う場合には、CPU はまず、上記培地交換操作において第 1 培養空間 4 6 a 内から廃培地 4 7 を汲み出す場合と同様に、第 1 液体排出配管 3 3 a と液体排出配管 8 1 とを連通させた後、第 1 培養空間 4 6 a 内の廃培地 4 7 を廃液タンク 1 6 へと排出させながら回動棒 2 5 a を上動させる。廃培地 4 7 の排出が終了したところで、第 4 電動バルブ 8 2 を閉鎖した後、傾斜ステージ 2 3 を水平状態に戻す。次に、CPU は第 1 ~ 第 3 電動バルブ 5 4、7 0、7 3 に切替信号を出力し、剥離剤配管 6 9 a、継代培養配管 7 1、液体供給配管 7 2 及び第 1 液体

供給配管 3 2 a を連通させた後、液体供給ポンプ 7 4 を駆動させて剥離剤タンク 6 2 内の細胞剥離剤を第 1 培養空間 4 6 a 内に供給させる。このとき、前記細胞剥離剤は保温庫 6 6 内の加温部 7 1 a を通過する際に加温されることにより、細胞に対する温度ショックを低減させるとともに細胞剥離剤の活性が高められる。そして、所定量の細胞剥離剤を供給したところで、CPU は第 1 及び第 3 電動バルブ 5 4, 7 3 を閉鎖させる。

【0060】次に、CPU は CCD カメラ 2 2 から画像処理装置 1 0 5 を介して入力される部分領域データに基づいて、親水性フィルム 4 3 上に接着された細胞像がほとんど確認されなくなった（接着している細胞が剥離された）時点で剥離停止剤を第 1 培養空間 4 6 a 内に供給させる。すなわち、CPU はまず、第 1 ～第 3 電動バルブ 5 4, 7 0, 7 3 に切替信号を出力し、剥離停止剤配管 6 9 b、継代培養配管 7 1、液体供給配管 7 2 及び第 1 液体供給配管 3 2 a を連通させる。さらに、CPU は液体供給ポンプ 7 4 を駆動させて剥離停止剤タンク 6 3 内の剥離停止剤を第 1 培養空間 4 6 a 内に供給させる。所定時間静置させた後、CPU は第 1 及び第 3 電動バルブ 5 4, 7 3 に切替信号を出力し、第 2 培地供給配管 6 7 b、液体供給配管 7 2 及び第 1 液体供給配管 3 2 a を連通させる。続いて、CPU は液体供給ポンプ 7 4 を駆動させて加温培地タンク 6 5 内の培地 4 7 を第 1 培養空間 4 6 a 内に送り込んで細胞懸濁液を調製する。

【0061】次に、CPU は第 4 電動バルブ 8 2 に切替信号を出力し、第 1 及び第 2 液体排出配管 3 3 a, 3 3 b を連通させた後、細胞移動ポンプ 8 4 を駆動させて第 1 培養空間 4 6 a 内の細胞懸濁液を第 2 培養空間 4 6 b 内に送り込みながら、第 1 培養ユニット 1 2 a の傾斜ステージ 2 3 を傾斜させる。そして、前記細胞移動ポンプ 8 4 の駆動が停止したところで、CPU は第 4 電動バルブ 8 2 を閉鎖させる。

【0062】最後に、CPU は第 2 培養ユニット 1 2 b の CCD カメラ 2 2、保温プレート 2 6 及び照明装置 1 0 7 の電源をオンするとともに、第 1 培養ユニット 1 2 a の CCD カメラ 2 2 からの入力を第 2 培養ユニット 1 2 b の CCD カメラ 2 2 からの入力に切り替える。さらに、CPU は第 5 及び第 6 電動バルブ 9 5, 9 7 に切替信号を出力し、第 2 培養ユニット 1 2 b の培養容器 3 1 内にガスを供給させる。続いて、CPU は S 3 に戻って上記第 1 培養ユニット 1 2 a 内で行われていた処理と同様の処理を第 2 培養ユニット 1 2 b で実行する。

【0063】なお、この第 2 培養ユニット 1 2 b において S 9 及び S 2 0 の培地交換操作を行う際には、CPU はまず、第 4 電動バルブ 8 2 に切替信号を出力し、第 2 液体排出配管 3 3 b と液体排出配管 8 1 とを連通させた後、液体排出ポンプ 8 3 を駆動させて第 2 培養空間 4 6 b 内の廃培地 4 7 を廃液タンク 1 6 へと排出させながら、傾斜ステージ 2 3 を傾斜させる。そして、第 2 培養

空間 4 6 b 内の廃培地 4 7 が排出されたところで、CPU は第 4 電動バルブ 8 2 を閉鎖させるとともに傾斜ステージ 2 3 を水平状態に戻す。次に、CPU は第 1 及び第 3 電動バルブ 5 4, 7 3 に切替信号を出力し、第 2 培地供給配管 6 7 b、液体供給配管 7 2 及び第 2 液体供給配管 3 2 b を連通させた後、液体供給ポンプ 7 4 を駆動させて加温培地タンク 6 5 内の加温培地 4 7 を第 2 培養空間 4 6 b 内に供給させる。その後、第 1 及び第 3 電動バルブ 5 4, 7 3 を閉鎖させる。

【0064】従って、この第 1 実施形態の培養装置 1 1 は、CCD カメラ 2 2 により培養容器 3 1 内の細胞の画像データを制御装置 1 0 1 に入力し、その画像データに基づいて制御装置 1 0 1 により接着細胞濃度を算出し、その算出結果に基づいて培地交換操作及び継代培養操作を実行するタイミングを決定し、その操作を細胞培養装置 1 1 各部に実行させるように構成されている。このため、制御装置 1 0 1 が常に細胞の状態を正確に把握して無駄のない培養操作を行うように指示するとともに、ほとんど全ての培養操作が自動的に行われ、細胞培養に要する手間、時間及び費用を著しく低減させることができることから、細胞培養に適した条件を維持しつつ、培養操作を容易に行うことができる。

【0065】特に、算出された接着細胞濃度の増加率又は増加割合に基づいて、接着後培地交換工程における培地交換操作のタイミングが決定されることから、より多くの接着可能な細胞を接着させることができるうえ、細胞剥離剤及び剥離停止剤に細胞が曝される時間を可能な限り短縮し、それらの細胞毒性による害を軽減させることができる。さらに、計算された累積培地消費量に基づいて、培地交換操作を行うタイミングが決定されることから、培地 4 7 の無駄を低減させつつ、効率的な細胞培養を行わせることができる。加えて、前記従来の細胞培養方法と比較して、雑菌が混入する可能性を著しく低減させることもできる。また、この実施形態の細胞培養方法についても前記細胞培養装置 1 1 と同様の効果が発揮される。

（第 2 実施形態）この発明の第 2 実施形態を上記第 1 実施形態と異なる点を中心に説明する。

【0066】図 9 及び図 10 (a) に示すように、第 2 実施形態の細胞培養装置 1 1 は 1 つの培養ユニット 1 2 を備えている。この培養ユニット 1 2 を構成する培養容器 3 1 は透明な合成樹脂により四角筒状に形成されている。この培養容器 3 1 のヒンジ部 2 4 側の側面である開口面 3 1 a は、培養容器 3 1 に対して開閉可能に嵌合され、培養容器 3 1 が開口又は密閉されるようになっている。また、図 10 (b) に示すように、前記開口面 3 1 a 及びその開口面 3 1 a と対向する前後両内側面の周縁部には、係合凸部 3 1 b がほぼ四角棒状に突設されている。

【0067】図 10 (a) に示すように、培養容器 3 1

の中央には前後方向に延びる回転軸 111 が挿通されている。この回転軸 111 は、培養容器 31 の前後両外側面を螺着固定するためのナット 111a を備えており、それら前後一対のナット 111a で前記両外側面を押圧することにより、回転軸 111 の所定位置に培養容器 31 を支持固定することができるようになっている。この回転軸 111 は、培養ユニット 12 のヒンジ部 24 側に位置する図示しない回動基端部を中心に上下方向に所定角度回動させることができるうえ、回転軸 111 を上方に所定角度回動させた状態で、回転軸 111 を軸に培養容器 31 を反時計方向に 90° ずつ回転させることができるようになっている。また、図 10 (b) に示すように、培養容器 31 内に配設された回転軸 111 の中央には照明装置 112 が吊下され、培養容器 31 の底部を常に照明するようになっている。

【0068】図 10 (a) に示されるように、開口面 31a の上下及び左右端部には、下端部から時計方向に順に第 1 液体供給配管 32a、第 1 液体排出配管 33a、第 2 液体供給配管 32b、第 2 液体排出配管 33b、第 3 液体供給配管 32c、第 3 液体排出配管 33c、第 4 液体供給配管 32d 及び第 4 液体排出配管 33d が接続されている。また、前記回転軸 111 の両側方位置の開口面 31a には、ガス供給配管 34 及びガス排出配管 35 が接続されている。

【0069】図 10 (b) に示すように、この培養容器 31 の回転軸 111 を取り囲む 4 つの内側面には、下から反時計方向に順に第 1 培養皿 41a、第 2 培養皿 41b、第 3 培養皿 41c 及び第 4 培養皿 41d が添着されている。前記第 1 及び第 2 培養皿 41a、41b はそれぞれ上記第 1 実施形態と同じ構造を有している。また、第 3 培養皿 41c は前記第 2 培養皿 41b の第 2 培養空間 46b よりも広い第 3 培養空間 46c を有する第 3 樹脂堰 44c を備えている。第 4 培養皿 41d は前記第 3 培養皿 41c の第 3 培養空間 46c よりも広い第 4 培養空間 46d を有する第 4 樹脂堰 44d を備えている。

【0070】図 9 に模式的に示すように、第 1 電動バルブ 54 と接続された液体供給配管 72 の他端は第 7 電動バルブ 113 と接続されている。さらに、この第 7 電動バルブ 113 は、第 1 液体分配配管 114 及び第 2 液体分配配管 115 と接続されている。前記第 1 液体分配配管 114 の他端は第 8 電動バルブ 116 と接続されている。この第 8 電動バルブ 116 は前記第 1 液体供給配管 32a 及び第 2 液体供給配管 32b と接続されている。また、前記第 2 液体分配配管 115 の他端は第 9 電動バルブ 117 と接続されている。この第 9 電動バルブ 117 は前記第 3 液体供給配管 32c 及び第 4 液体供給配管 32d と接続されている。

【0071】一方、液体排出配管 81 は廃液タンク 16 及び第 10 電動バルブ 121 と接続されている。この第 10 電動バルブ 121 は第 1 液体移動配管 122、第 2

液体移動配管 123 及び第 3 液体移動配管 124 と接続されている。前記第 1 液体移動配管 122 は第 11 電動バルブ 125 と接続されている。この第 11 電動バルブ 125 は前記第 1 液体排出配管 33a 及び第 2 液体排出配管 33b と接続されている。また、第 1 液体排出配管 33a の途中には第 1 細胞移動ポンプ 126 が設けられ、第 2 液体排出配管 33b の途中には双方向移動可能な第 2 細胞移動ポンプ 127 が設けられている。

【0072】前記第 2 液体移動配管 123 は第 12 電動バルブ 128 と接続されている。この第 12 電動バルブ 128 は前記第 3 液体排出配管 33c 及び第 4 液体排出配管 33d と接続されている。これら第 3 液体排出配管 33c 及び第 4 液体排出配管 33d の途中にはそれぞれ、いずれも双方向移動可能な第 3 細胞移動ポンプ 129 及び第 4 細胞移動ポンプ 130 が設けられている。さらに、前記第 3 液体移動配管 124 は継代培養時に細胞懸濁液を一時的に貯留するための細胞貯留タンク 131 と接続されている。

【0073】ガス交換ユニット 18 を構成する加湿器 92 は前記ガス供給配管 34 と接続されている。このガス供給配管 34 の途中には前記ガス循環ポンプ 96 が設けられている。また、ガスアナライザ 93 は前記ガス排出配管 35 と接続されている。その他の構成は上記第 1 実施形態と同様である。

【0074】図 11 に示すように、第 2 実施形態の CPU は回転軸 111 に回転信号を出力し、図示しない回動基端部を中心に回転軸 111 を所定角度上動させるとともに、その回転軸 111 を軸に培養容器 31 を 90° 回転させた後、回転軸 111 を下動させて培養容器 31 を傾斜ステージ 23 上に載置する。CPU は第 7 電動バルブ 113 に切替信号を出力し、液体供給配管 72 と、第 1 液体分配配管 114 又は第 2 液体分配配管 115 とを連通させる。CPU は第 8 電動バルブ 116 に切替信号を出力し、第 1 液体分配配管 114 と、第 1 液体供給配管 32a 又は第 2 液体供給配管 32b とを連通させる。CPU は第 9 電動バルブ 117 に切替信号を出力し、第 2 液体分配配管 115 と、第 3 液体供給配管 32c 又は第 4 液体供給配管 32d とを連通させる。

【0075】CPU は第 10 電動バルブ 121 に切替信号を出力し、第 1 液体移動配管 122 及び液体排出配管 81、第 2 液体移動配管 123 及び液体排出配管 81、第 1 液体移動配管 122 及び第 3 液体移動配管 124、又は第 3 液体移動配管 124 及び第 2 液体移動配管 123 を連通させる。CPU は第 11 電動バルブ 125 に切替信号を出力し、第 1 液体排出配管 33a 及び第 1 液体移動配管 122、又は第 2 液体排出配管 33b 及び第 1 液体移動配管 122 を連通させる。

【0076】CPU は第 1 細胞移動ポンプ 126 に駆動信号を出力して第 1 培養空間 46a 内の液体（廃培地 47 又は細胞懸濁液）を汲み出して廃液タンク 16 又は細

胞貯留タンク131に移動させる。CPUは第2細胞移動ポンプ127に駆動信号を出力し、第2培養空間46b内の液体（廃培地47又は細胞懸濁液）を汲み出して廃液タンク16又は細胞貯留タンク131に移動させるとともに、細胞貯留タンク131内の細胞懸濁液を第2培養空間46b内に移動させる。

【0077】CPUは第12電動バルブ128に切替信号を出力し、第3液体排出配管33c及び第2液体移動配管123、又は第4液体排出配管33d及び第2液体移動配管123を連通させる。CPUは第3細胞移動ポンプ129に駆動信号を出力し、第3培養空間46c内の液体（廃培地47又は細胞懸濁液）を汲み出して廃液タンク16又は細胞貯留タンク131に移動させるとともに、細胞貯留タンク131内の細胞懸濁液を第3培養空間46c内に移動させる。CPUは第4細胞移動ポンプ130に駆動信号を出力し、第4培養空間46d内の液体（廃培地47又は細胞懸濁液）を汲み出して廃液タンク16又は細胞貯留タンク131に移動させるとともに、細胞貯留タンク131内の細胞懸濁液を第4培養空間46d内に移動させる。

【0078】この第2実施形態の制御装置101は、上記構成に加えて、保温プレート26、照明装置107、第3電動バルブ73、第4電動バルブ82、液体排出ポンプ83、細胞移動ポンプ84、第5電動バルブ95及び第6電動バルブ97の構成がないこと以外は、上記第1実施形態と同様である。

【0079】上記細胞培養装置11の作用について以下に記載する。さて、上記細胞培養装置11を用いて接着依存性細胞を培養する際にはまず、上記第1実施形態と同様に第1～第4培養皿41a、41b、41c、41dを無菌的に組み立てた後、各培養皿41a、41b、41c、41dの各係止突部45dを培養容器31の係合凸部31bに係合させて所定位置に添着させながら開口面31aで培養容器31を密閉するとともに、培養容器31に回転軸111を挿通する。続いて、第1培養皿41aが添着された側面を保温プレート26の上面中央部に載置した後、前後一対のナット111aにより培養容器31を回転軸111に支持固定させる。そして、充分量の培地47、細胞剥離剤、剥離停止剤、炭酸ガス、酸素ガス及び水を充填した後、キーボード103からCPUに開始信号を入力する。

【0080】前記開始信号によりCPUは上記第1実施形態と同様の処理を行う。すなわち、まずS1において細胞培養装置11各部の動作環境確認を行って、CCDカメラ22、保温プレート26、照明装置112、簡易冷蔵庫64、保温庫66、ガスアナライザ93、ガス循環ポンプ96及び培地残量センサ65aの電源をオンにする。すると、照明装置112が第1培養皿41aを照明するとともに、CCDカメラ22が第1培養空間46a内の映像をモニタ104に映し出す。また、上記第1

実施形態と同様に、細胞培養装置11各部の動作環境データをモニタ104に表示するとともに、加温培地タンク65内に所定量の培地47を移動させる。さらに、ガスアナライザ93から入力される成分分析データに基づいて調整されたガスをガス循環ポンプ96により培養容器31内に供給させる。最後に、モニタ104に準備完了表示させる。

【0081】次に、S2において細胞の接種を行う。すなわち、クリーンベンチ51内で調製された細胞懸濁液に細胞供給配管52の先端を挿入した状態で供給スイッチ53を押圧することによって、CPUは第1、第7及び第8電動バルブ54、113、116に切替信号を出力し、細胞供給配管52、液体供給配管72、第1液体分配配管114及び第1液体供給配管32aを連通させた後、液体供給ポンプ74を駆動させて前記細胞懸濁液を第1培養空間46a内に供給させる。続いて、制御装置101は上記第1実施形態と同様にS3～S8の処理を行う。

【0082】S9において培地交換操作を行う際にはまず、CPUは第10及び第11電動バルブ121、125に切替信号を出力し、第1液体排出配管33a、第1液体移動配管122及び液体排出配管81を連通させた後、第1細胞移動ポンプ126を駆動させて第1培養空間46a内の廃培地47を廃液タンク16へと排出させながら傾斜ステージ23を傾斜させる。そして、第1培養空間46a内の廃培地47が排出されたところで第1電動バルブ125を閉鎖させた後、傾斜ステージ23を水平状態に戻す。次に、CPUは第1、第7及び第8電動バルブ54、113、116に切替信号を出力し、第2培地供給配管67b、液体供給配管72、第1液体分配配管114及び第1液体供給配管32aを連通させた後、液体供給ポンプ74を駆動させて加温培地タンク65内の加温培地47を第1培養空間46a内に供給させる。そして、前記液体供給ポンプ74の駆動が停止したところで第1、第7及び第8電動バルブ54、113、116を閉鎖させる。

【0083】次に、上記第1実施形態と同様にS10～S15の処理を行う。このS15において、CPUは前記S14においてRAMに記憶された接着細胞濃度がデータファイル102に記憶された設定値（限界値）未満である場合には、S16及びS18～S20の処理を行う。なお、このS20における培地交換操作は前記第2実施形態のS9と同様である。逆に前記接着細胞濃度が限界値以上である場合にはS17の処理を行う。

【0084】CPUはS17において、現在接着依存性細胞が第1～第4培養皿41a、41b、41c、41dのいずれの培養皿で培養されているかを判断して継代培養操作が可能であるか否かを判別する。そして、CPUは、継代培養操作が可能である（現在第1～第3培養皿41a、41b、41cで培養が行われている）場合

にはS 2 1で継代培養操作を行い、不可能である（現在第4培養皿4 1 dで培養が行われている）場合には上記第1実施形態と同様にS 2 2の処理を行った後にS 1 9の処理を行う。

【0085】S 2 1において継代培養操作を行う際には、CPUはまず、上記培地交換操作において第1培養空間4 6 a内から廃培地4 7を汲み出す場合と同様に、第1液体排出配管3 3 a、第1液体移動配管1 2 2及び液体排出配管8 1を連通させた後、第1培養空間4 6 a内の廃培地4 7を廃液タンク1 6へと排出させながら傾斜ステージ2 3を傾斜させる。廃培地4 7の排出が終了したところで、第11電動バルブ1 2 5を閉鎖させるとともに、傾斜ステージ2 3を水平状態に戻す。次に、CPUは第1、第2、第7及び第8電動バルブ5 4、7 0、1 1 3、1 1 6に切替信号を出力し、剥離剤配管6 9 a、継代培養配管7 1、液体供給配管7 2、第1液体分配配管1 1 4及び第1液体供給配管3 2 aを連通させる。さらに、CPUは液体供給ポンプ7 4を駆動させて剥離剤タンク6 2内の細胞剥離剤を第1培養空間4 6 a内に供給させた後、第1、第2、第7及び第8電動バルブ5 4、7 0、1 1 3、1 1 6を閉鎖させる。

【0086】次に、CPUはCCDカメラ2 2から入力される部分領域データに基づいて、親水性フィルム4 3上に接着された細胞像がほとんど確認されなくなった時点で、剥離停止剤を第1培養空間4 6 a内に供給する。すなわち、CPUはまず、第1、第2、第7及び第8電動バルブ5 4、7 0、1 1 3、1 1 6に切替信号を出力し、剥離停止剤配管6 9 b、継代培養配管7 1、液体供給配管7 2、第1液体分配配管1 1 4及び第1液体供給配管3 2 aを連通させる。さらに、CPUは液体供給ポンプ7 4を駆動させて剥離停止剤タンク6 3内の剥離停止剤を第1培養空間4 6 a内に供給させる。所定時間静置させた後、CPUは第1、第7及び第8電動バルブ5 4、1 1 3、1 1 6に切替信号を出力し、第2培地供給配管6 7 b、液体供給配管7 2、第1液体分配配管1 1 4及び第1液体供給配管3 2 aを連通させた後、液体供給ポンプ7 4を駆動させて加温培地タンク6 5内の培地4 7を第1培養空間4 6 a内に送り込んで細胞懸濁液を調製する。

【0087】次に、CPUは第10及び第11電動バルブ1 2 1、1 2 5に切替信号を出力し、第1液体排出配管3 3 a、第1液体移動配管1 2 2及び第3液体移動配管1 2 4を連通させる。続いて、CPUは第1細胞移動ポンプ1 2 6を駆動させて第1培養空間4 6 a内の細胞懸濁液を細胞貯留タンク1 3 1内に供給させながら、傾斜ステージ2 3を傾斜させる。さらに、前記第1細胞移動ポンプ1 2 6の駆動が停止したところで、CPUは第11電動バルブ1 2 5を閉鎖させる。

【0088】次に、CPUは回転軸1 1 1に回転信号を出力し、図示しない回転基端部を中心に回転軸1 1 1を

上方に所定角度回転させ、回転軸1 1 1を軸に培養容器3 1を90°回転させた後、回転基端部を中心に回転軸1 1 1を下方に回転させて傾斜ステージ2 3上に載置する。このとき、第2培養皿4 1 bが添着された培養容器3 1の側面が傾斜ステージ2 3上に載置され、この第2培養空間4 6 b内で細胞を培養することができる状態になっている。

【0089】次に、CPUは第10及び第11電動バルブ1 2 1、1 2 5に切替信号を出力し、第2液体排出配管3 3 b、第1液体移動配管1 2 2及び第3液体移動配管1 2 4を連通させた後、第2細胞移動ポンプ1 2 7を駆動させて細胞貯留タンク1 3 1内の細胞懸濁液を第2培養空間4 6 b内に供給する。さらに、前記第2細胞移動ポンプ1 2 7の駆動が停止したところで、第11電動バルブ1 2 5を閉鎖させた後、CPUはこの第2培養空間4 6 b内の接着依存性細胞に対してS 3の処理に戻った後に上記と同様な一連の処理を繰り返す。

【0090】そして、この細胞培養装置1 1により培養されている接着依存性細胞は、第2培養空間4 6 bから第3培養空間4 6 cを経て第4培養空間4 6 dへと順次継代培養される。さらに、第4培養空間4 6 d内における培養時に、図8のS 1 7において継代培養操作が可能でないと判断した場合には、上記第1実施形態と同様にCPUはS 2 2の処理を行う。

【0091】なお、これら各継代培養操作において細胞懸濁液を移動させる際には、上記と同様に、細胞懸濁液は一旦細胞貯留タンク1 3 1内で貯留され、回転軸1 1 1を軸に培養容器3 1を回転させた後に新しい培養皿内に移動されるという過程を経て移動される。また、培地交換操作及び継代培養操作において液体が供給される際には、上記と同様に、液体が収容されているタンクと、その液体が供給される培養皿との間を繋ぐ液体配管1 3をCPUにより適宜選択するとともに、その選択された配管に設けられたポンプを駆動させて液体の供給が行われる。液体を排出する場合も同様である。

【0092】従って、この第2実施形態の細胞培養装置1 1は、上記第1実施形態と同様の効果を発揮することができるうえ、細胞培養装置1 1の大型化を抑えつつ、より多くの継代培養操作を行うことができる。特に、多くの継代培養操作を行って大量の細胞を培養する際には、培養容器3 1の個数を増やす必要はなく培養容器3 1の側面の数とそれに伴う培養皿や液体配管1 3等を付加することによって、ステージ台2 1やCCDカメラ2 2等の複雑かつ高価な構成を追加することなく、ほぼそのままの簡単な構成で大量培養を行うことができる。

【0093】なお、上記各実施形態は、次のように変更して具体化することも可能である。

- ・ 親水性フィルム4 3上に接着した細胞の密度を表す接着細胞濃度の代わりに、親水性フィルム4 3上に接着した細胞の数を表す接着細胞数、親水性フィルム4 3上

に接着した細胞が占める面積を表す接着細胞占有面積、又は親水性フィルム 43 の接着可能面積に対する前記接着細胞占有面積の割合を示す接着細胞占有率を算出すること。このように構成した場合でも同様な効果を奏する。

【0094】・ S16において累積培地消費量を計算する代わりに、培養容器 31 内に、培地 47 中の成分

(好ましくは最も消費されやすい成分又は測定が容易な成分、例えばグルタミン、グルタミン酸塩、グルコース、乳酸塩)の残量を測定するための培地成分残量測定センサを設け、そのセンサで測定された成分量に基づいて、S18において培地交換操作を行うか否かを判断するように構成すること。このように構成した場合、培地交換操作を実行するタイミングをより正確に決定することができる。

【0095】・ 培養容器 31 を振動させるためのバイブレータ手段を傾斜ステージ 23 の下面に設けること。このように構成した場合、継代培養操作における細胞剥離工程において培養容器 31 を振動させることにより、細胞剥離剤による細胞の剥離反応をより一層高めることができる。

【0096】・ 細胞培養装置 11 に、カルシウムイオン不含リン酸緩衝液やカルシウムイオン不含無血清培地等のカルシウムイオン不含洗浄用等張液を収容するための洗浄液タンクを設け、そのタンクと第 2 電動バルブ 70 との間に洗浄液配管を接続すること。さらに、継代培養する際の廃培地 47 抜き取り操作の直後に、細胞が接着されている培養空間内に前記洗浄用等張液を供給して汲み出す操作を行って、前記培養空間内のカルシウムイオンを除去するように構成すること。このように構成した場合、細胞剥離工程の進行をより一層促進させることができる。

【0097】・ 継代培養時に剥離停止剤を添加しないこと。このように構成した場合でも、培地 47 中に含有されているカルシウムイオンによって細胞剥離剤の活性を抑制して細胞を親水性フィルム 43 上に接着させることができるうえ、剥離停止剤による細胞毒性を低減させることができる。

【0098】・ 第 2 実施形態において、S17における継代培養操作が可能か否かを判断する際に、あらかじめキーボード 103 から入力された培養皿の個数に基づいて CPU が判断するように構成すること。このように構成した場合、所望とする培養条件を容易に整えることができる。

【0099】・ 第 2 実施形態の培養容器 31 を例えば、横三角筒状、横六角筒状又は横八角筒状等の横多角筒状に形成するとともに、培養皿の個数を例えば、3 個、6 個又は 8 個とすること。このように構成した場合、細胞培養装置 11 を用いて所望とする回数の継代培養操作を容易に行うことができる。

【0100】・ 第 2 実施形態の各プレート 42 を省略し、培養容器 31 の 4 つの内側面に、親水性フィルム 43 及び第 1～第 4 樹脂堰 44a, 44b, 44c, 44d を添着するように構成すること。このように構成した場合、培養容器 31 の構成を簡略化することができる。

【0101】・ 第 2 実施形態において、傾斜ステージ 23 及び回動装置 25 を省略すること。さらに、保温プレート 26 を培養皿 41a, 41b, 41c, 41d の下面に設けるか、或いはガス交換ユニット 18 から所定温度 (例えば 37℃) のガスを供給するように構成するのが好ましい。このように構成した場合、細胞培養装置 11 の構成を簡略化することができるうえ、回動基端部を中心に培養容器 31 を所定角度傾斜させることができることから、培養空間内の液体を効率的に除去することができる。

【0102】・ 第 2 実施形態において、回動基端部を中心に回転軸 111 を上下方向に回動させる代わりに、水平状態を保持したまま回転軸 111 を上下動させるように構成すること。或いは、回転軸 111 を回動しないように構成するとともに、傾斜ステージ 23 を上下動させるように構成すること。このように構成した場合、培養容器 31 を容易に回転させることができる。

【0103】・ インターネットを利用して細胞培養装置 11 各部の動作環境データを閲覧することができるように構成すること。さらに、インターネットを介して制御装置 101 を制御することができるように構成するのが好ましい。このように構成した場合、細胞の培養状態を遠方においても容易に把握することができる。

【0104】・ 第 1 実施形態の細胞培養装置 11 を、第 1 培養ユニット 12a 又は第 2 培養ユニット 12b と、制御装置 101 のみによって構成すること。或いは、第 2 実施形態の細胞培養装置 11 を、培養ユニット 12 と、制御装置 101 のみによって構成すること。このように構成した場合、細胞培養装置 11 の構成を簡略化することができる。さらに、画像入力手段としての CCD カメラ 22 から取り込まれた細胞の状態等が、出力手段としてのモニタ 104 に操作の実行を指示する出力信号としての画面表示をさせることができることから、培養操作を行うタイミングを容易に把握することができる。

【0105】・ 第 1 実施形態の細胞培養装置 11 の第 2 培養ユニット 12b、剥離剤タンク 62、剥離停止剤タンク 63 及びそれらに接続される配管、電動バルブ、ポンプ等を省略し、培地交換操作のみを自動的に行うように構成すること。さらに、細胞供給ユニット 14 を省略してもよい。このように構成した場合、細胞培養装置 11 の構成を簡略化しつつ、培地交換操作を自動的に行うことができる。

【0106】・ S6において、RAMに記憶された接着細胞濃度の算出結果に基づいて、接着細胞濃度の増加

率又は増加割合の増加曲線又は増加直線をCPUに予測させ、その予測結果に基づいてS9における接着後培地交換操作を行う時期（タイミング）をモニタ104に出力するように構成すること。このように構成した場合、細胞培養に要する時間を容易に予測できることから、スケジュールの調整を容易に行うことができる。

【0107】・ RAMに記憶された培地消費量の計算結果に基づいて、累積培地消費量の増加曲線又は増加直線をCPUに予測させ、その予測結果に基づいてS20における培地交換操作を行う時期（タイミング）をモニタ104に出力するように構成すること。このように構成した場合、細胞培養に要する時間を容易に予測できることから、スケジュールの調整を容易に行うことができる。

【0108】・ S14において、RAMに記憶された接着細胞濃度の算出結果に基づいて、接着細胞濃度の増加曲線又は増加直線をCPUに予測させ、その予測結果に基づいてS21における継代培養操作を行う時期（タイミング）をモニタ104に出力するように構成すること。このように構成した場合、細胞培養に要する時間を容易に予測できることから、スケジュールの調整を容易に行うことができる。

【0109】・ CCDカメラ22にスキャン装置を設け、レンズ22aの焦点深度を連続的に変化させて撮影するように構成すること。さらに、前記撮影された画像データから培養容器31内に接種された細胞懸濁液中の全ての細胞数（接種細胞濃度）を算出するように構成すること。このように構成した場合、細胞接種操作時及び継代培養操作時において接種細胞濃度を算出することによって、その濃度を利用して細胞接着期（接着依存性細胞を培養容器に接種してからその培養容器の底面に接着するまでのステージ）における培養時間と細胞の接着率との関係を示す接着率曲線を求めることができる。

【0110】さらに、前記接着率曲線の標準曲線を作製してデータファイル102に記憶させ、その記憶された標準曲線及び前記算出された接種細胞濃度に基づいて、CPUが細胞接種操作時及び継代培養操作時に、同種細胞の細胞接着期の細胞の挙動を予測して出力手段に出力するように構成すること。さらに、同種細胞を培養する度毎に接着率曲線を作製し、前記データファイル102に記憶された標準曲線を補正するように構成するのが好ましい。このように構成した場合、細胞培養に要する時間を容易に予測できることから、スケジュールの調整を容易に行うことができる。

【0111】・ 誘導期（前記細胞接着期の終了後から接着した細胞が細胞分裂を開始するまでのステージ）における接着細胞濃度の算出結果に基づいて、CPUに誘導期の期間を表すラグタイムを計算させた後、前記接種細胞濃度とラグタイムに基づいて、CPUが同種細胞の誘導期の細胞の挙動を予測して出力手段に出力するよう

に構成すること。さらに、同種細胞を培養する度毎に予測結果と実測値とのずれを補正し、次回からの予測に利用できるように構成するのが好ましい。このように構成した場合、スケジュールの調整を容易に行うことができる。

【0112】・ 対数増殖期（前記誘導期の終了後から細胞がほぼコンフルエント状態になるまでのステージ）における接着細胞濃度の算出結果に基づいて、CPUに細胞分裂の間隔を表す平均の倍加時間又は見かけの倍加時間を計算させた後、その計算結果に基づいてコンフルエント状態になるまでの期間を予測させ、出力手段に出力するように構成すること。さらに、同種細胞を培養する度毎に予測結果と実測値とのずれを補正し、次回からの予測に利用できるように構成するのが好ましい。このように構成した場合、スケジュールの調整を容易に行うことができる。

【0113】・ 前記接種細胞濃度に基づいて、前記接着率曲線、ラグタイム、及び平均の倍加時間又は見かけの倍加時間を予測し、各培養時間（特に対数増殖期以降）における接着細胞濃度を予測し、その予測結果を出力手段に出力するように構成すること。このように構成した場合、細胞培養に要する時間を容易に予測できることから、スケジュールの調整を容易に行うことができる。

【0114】・ 各実施形態の細胞培養装置11を用いて、接着依存性細胞を組織培養（多層化培養又は3次元培養）すること。すなわち、第1実施形態の第2培養空間46b内、又は第2実施形態の第4培養空間46d内でコンフルエント状態になった細胞を、必要に応じて組織培養用の培地47に交換し、さらにその培養空間内で継続して培養するようにキーボード103からCPUに修正信号を入力することができるよう構成すること。このように構成した場合、細胞培養装置11を用いて所望とする大きさの培養組織140を容易に得ることができる。

【0115】なお、前記培養された組織を取出す際にはまず、図12(a)に示すように、第1実施形態の第2培養皿41b又は第2実施形態の第4培養皿41dから第2樹脂堰44b又は第4樹脂堰44dを除去し、プレート42、親水性フィルム43及び培養組織140を取出す。続いて、棒状の把持部141と四角板状の密着板142とからなる組織取出し用治具143を用いて、前記培養組織140をプレート42及び親水性フィルム43から分離する。すなわち、まず前記把持部141を把持した状態で密着板142を培養組織140の上面に密着させた後、図12(b)に示されるように親水性フィルム43の端部を密着板142の上面に折り返す。次に、把持部141を把持して密着板142、培養組織140及び親水性フィルム43を持ち上げ、プレート42と親水性フィルム43とを分離する。最後に、親水性フ

ィルム43を培養組織140上から丁寧に剥離させることによって、密着板142上に密着した培養組織140が得られる。

【0116】さらに、前記実施形態より把握できる技術的思想について以下に記載する。

(1) 接着依存性細胞を継代培養操作しながら単層培養を行うための培養容器であって、前記培養容器を横多角筒状に形成し、その培養容器の各内側面に培養可能面積の異なる複数の培養皿を設け、培養可能面積の小さい培養皿からその次に培養可能面積の大きい培養皿に細胞を移動させるための細胞移動手段を設けるとともに、前記各培養皿が設けられた培養容器の側面を培養容器の下端部に位置変更するための位置変更手段を備えたことを特徴とする培養容器。このように構成した場合、狭いスペースでより多くの継代培養を容易に行うことができる。

【0117】(2) 前記培養容器を所定角度傾斜させるための傾斜手段を備えた請求項4から請求項6のいずれかに記載の細胞培養装置。このように構成した場合、充分な量の廃培地を容易に除去できることから培地交換効率を高めることができる。

【0118】(3) さらに、クリーンベンチ内に配設された細胞供給配管を含む細胞供給手段を備えた請求項4から請求項6及び前記(2)のいずれかに記載の細胞培養装置。このように構成した場合、接着依存性細胞を容易に細胞培養装置内に供給することができる。

【0119】

【発明の効果】以上詳述したように、この発明によれば、次のような効果を奏する。請求項1に記載の発明の細胞培養方法によれば、細胞培養に適した条件を維持しつつ、培養操作を容易に行うことができる。

【0120】請求項2に記載の発明の細胞培養方法によれば、請求項1に記載の発明の効果に加えて、継代培養操作時に、より多くの細胞を培養容器の底面に接着させることができるうえ、細胞に対するダメージを低減させることができる。

【0121】請求項3に記載の発明の細胞培養方法によれば、請求項1又は請求項2に記載の発明の効果に加えて、培地の無駄を少なくすることができる。請求項4に記載の発明の細胞培養装置によれば、細胞培養に適した条件を維持しつつ、培養操作を容易に行うことができる。

【0122】請求項5に記載の発明の細胞培養装置によれば、請求項4に記載の発明の効果に加えて、培養操作をさらに容易に行うことができる。請求項6に記載の発明の細胞培養装置によれば、請求項5に記載の発明の効果に加えて、細胞培養装置の大型化を抑えつつ、より多

くの継代培養操作を行うことができる。

【0123】請求項7に記載の発明の記録媒体によれば、細胞培養に適した条件を維持しつつ、培養操作を容易に行うことができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】 第1実施形態の細胞培養装置を示す模式図。

【図2】 第1実施形態の第1及び第2培養ユニットを示す斜視図。

【図3】 第1実施形態の第1培養ユニットを示す側断面図。

【図4】 (a)は第1実施形態の第1培養皿を示す斜視図、(b)は同じくクリップを示す斜視図。

【図5】 第1実施形態の第2培養皿を示す斜視図。

【図6】 第1実施形態の制御装置の電気的構成を示すブロック図。

【図7】 第1及び第2実施形態の制御装置の処理を示すフローチャート。

【図8】 図7の処理動作の続きを示すフローチャート。

【図9】 第2実施形態の細胞培養装置を示す模式図。

【図10】 (a)は第2実施形態の培養ユニットを示す斜視図、(b)は図10(a)の10b-10b線から見た培養容器を示す断面図。

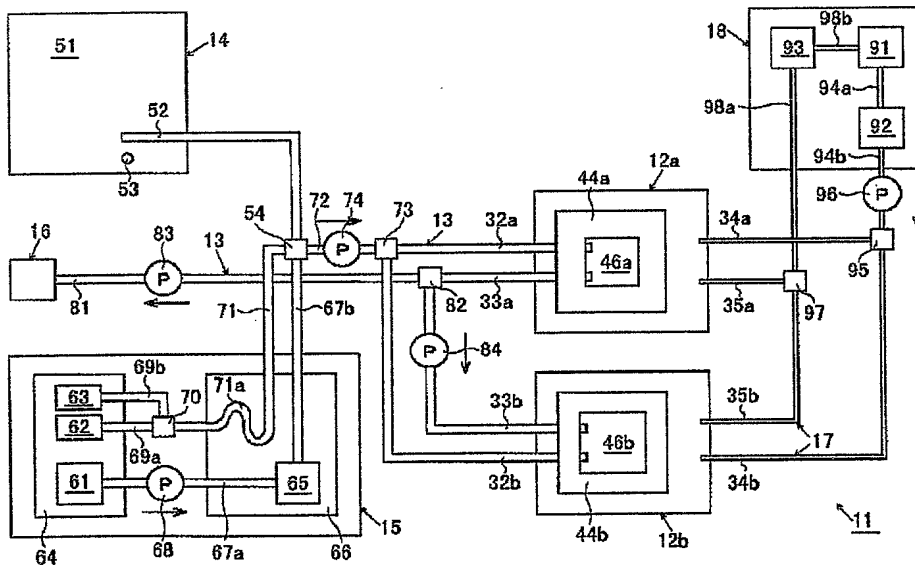
【図11】 第2実施形態の制御装置の電気的構成を示すブロック図。

【図12】 (a)は実施形態以外の組織取出し操作を示す斜視図、(b)は同じく正断面図。

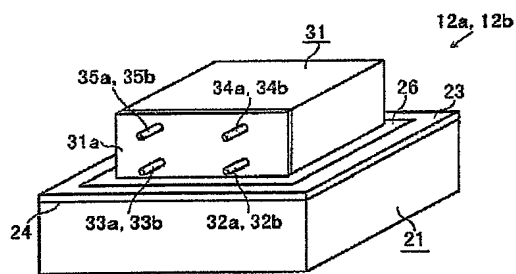
【符号の説明】

11…細胞培養装置、13…培地供給手段及び細胞剥離剤供給手段を構成する液体配管、15…培地供給手段及び細胞剥離剤供給手段を構成する液体供給ユニット、16…液体排出手段を構成する廃液タンク、22…画像入力手段としてのCCDカメラ、25…出力手段を構成する回動装置、31…培養容器、41a～41d…培養皿としての第1～第4培養皿、43…培養容器の底面を構成する親水性フィルム、47…培地、74…出力手段、培地供給手段及び細胞剥離剤供給手段を構成する液体供給ポンプ、83…出力手段及び液体排出手段を構成する液体排出ポンプ、84…出力手段及び細胞移動手段を構成する細胞移動ポンプ、101…制御手段としての制御装置、104…出力手段を構成するモニタ、105…制御手段を構成する画像処理装置、111…出力手段及び位置変更手段を構成する回転軸、126、127、129、130…出力手段、液体排出手段及び細胞移動手段を構成する第1～第4細胞移動ポンプ、131…細胞移動手段を構成する細胞貯留タンク。

【図 1】

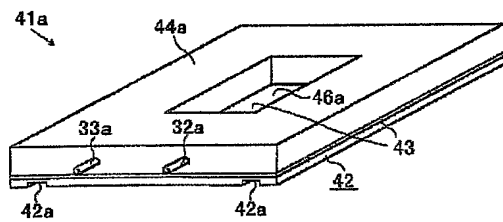


【図 2】

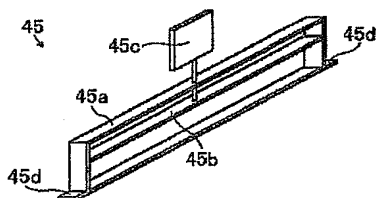


【図 4】

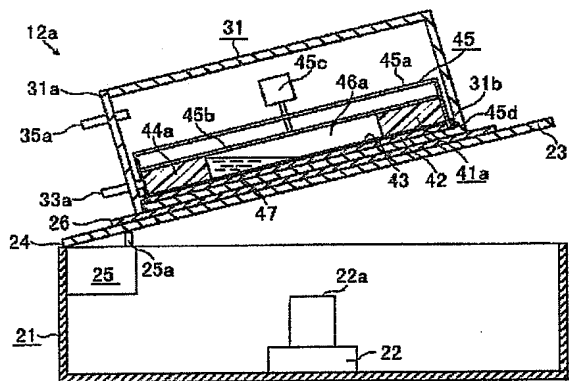
(a)



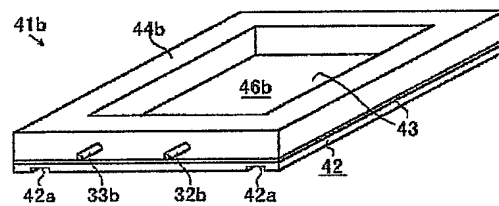
(b)



【図 3】



【図 5】

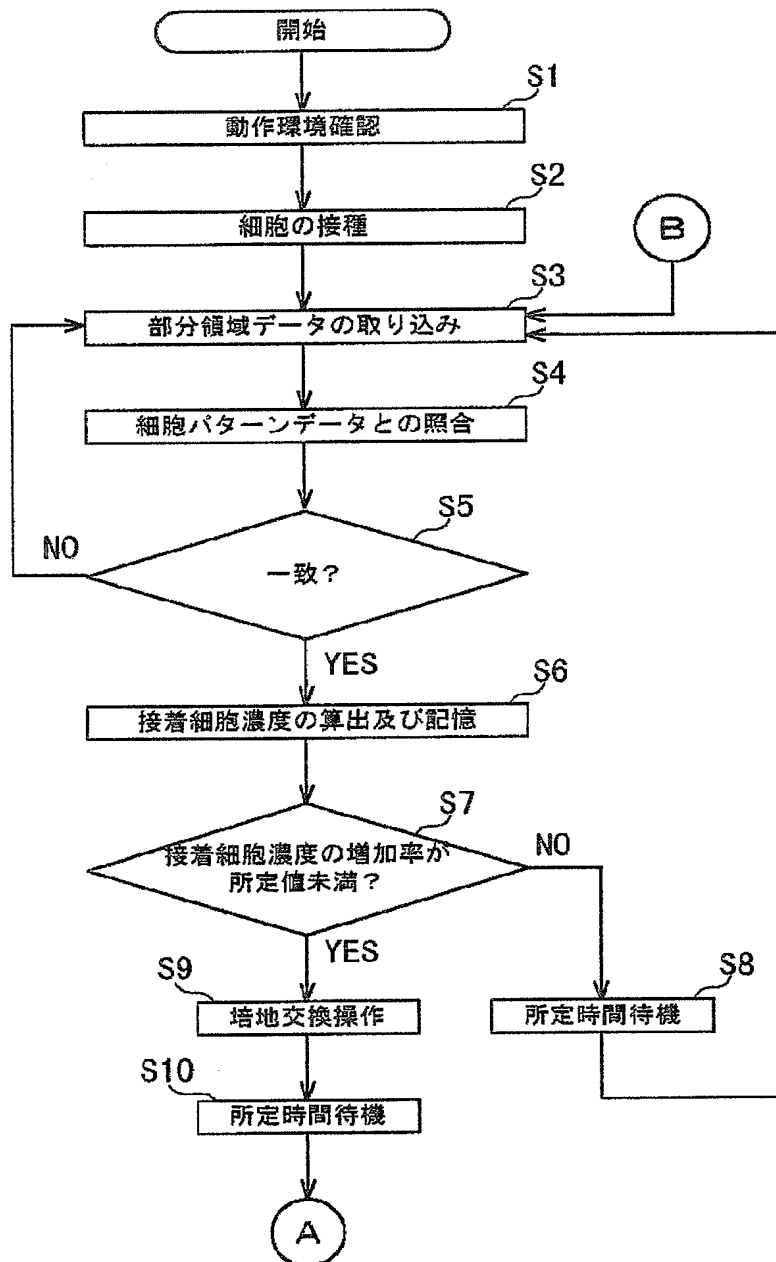


Block diagram of a control system (101) for a cell culture apparatus. The central CPU (101) is connected to various components:

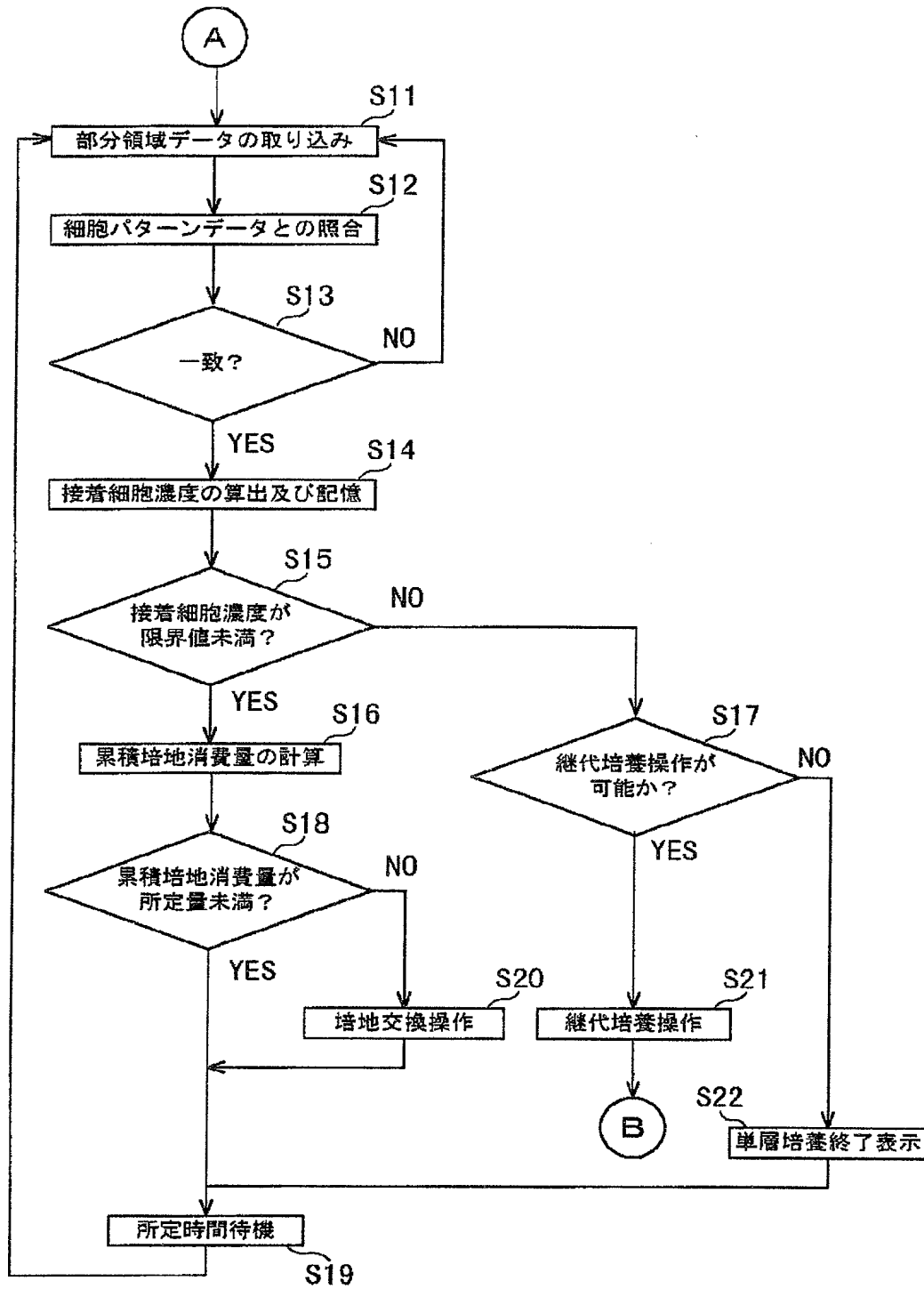
- Inputs to CPU (101):**
 - 22: CCD カメラ (CCD Camera)
 - 53: 供給スイッチ (Supply Switch)
 - 65a: 培地残量センサ (Medium Residual Sensor)
 - 93: ガスアナライザ (Gas Analyzer)
- Internal Components:**
 - 104: モニタ (Monitor)
 - 105: 画像処理装置 (Image Processing Device)
 - 106: 計時装置 (Timing Device)
 - ROM (Read Only Memory)
 - RAM (Random Access Memory)
 - データファイル (Data File) 102
 - キーボード (Keyboard) 103
- Outputs from CPU (101):**
 - 25: 回動装置 (Rotary Device)
 - 26: 保温プレート (Heating Plate)
 - 107: 照明装置 (Illumination Device)
 - 54: 第1電動バルブ (1st Electric Valve)
 - 58: 培地供給ポンプ (Medium Supply Pump)
 - 60: 第2電動バルブ (2nd Electric Valve)
 - 70: 第3電動バルブ (3rd Electric Valve)
 - 73: 液体供給ポンプ (Liquid Supply Pump)
 - 74: 第4電動バルブ (4th Electric Valve)
 - 82: 液体排出ポンプ (Liquid Exhaust Pump)
 - 83: 細胞移動ポンプ (Cell Movement Pump)
 - 84: ガス供給器 (Gas Supply Device)
 - 91: 加湿器 (Humidifier)
 - 92: 第5電動バルブ (5th Electric Valve)
 - 95: 第6電動バルブ (6th Electric Valve)
 - 97: 第7電動バルブ (7th Electric Valve)

[illegible]

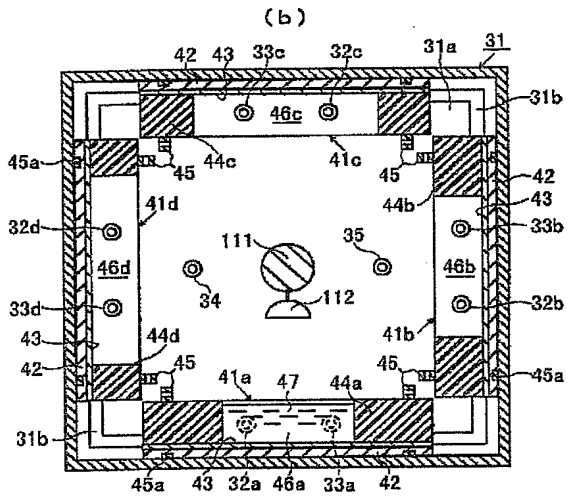
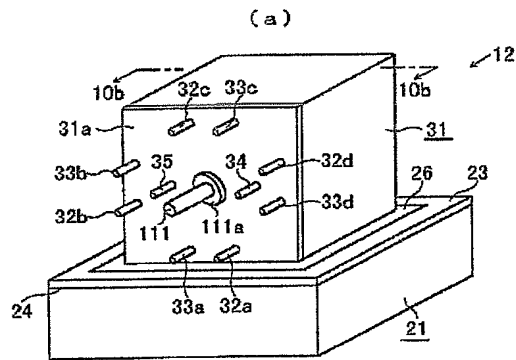
【図 7】



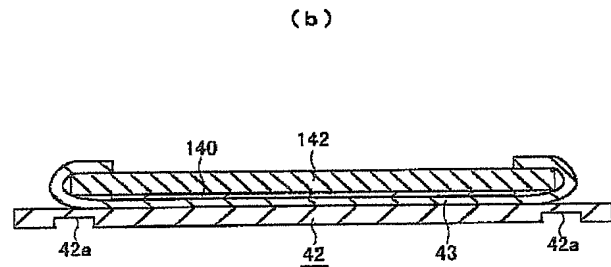
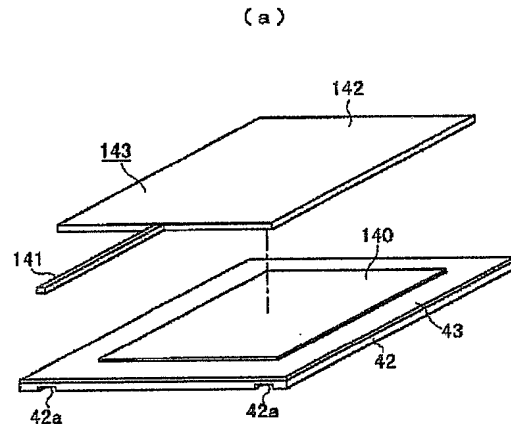
【図8】



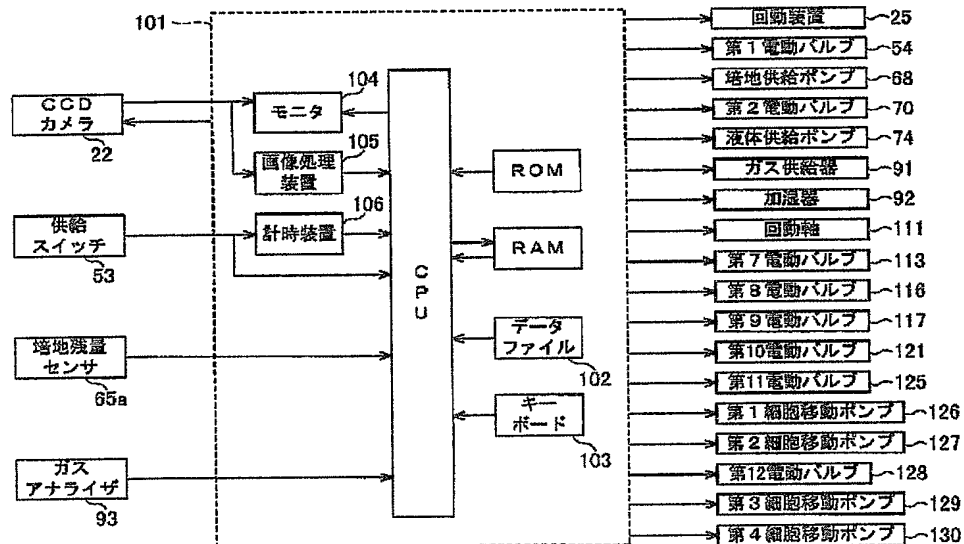
【図10】



【図12】



【図11】



フロントページの続き

(51) Int. Cl. ⁷	識別記号	F I	ターマコード (参考)
G 0 6 T 1/00	2 9 5	C 1 2 M 1/34	D
// C 1 2 M 1/34		(C 1 2 N 5/02	
(C 1 2 N 5/02		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		(C 1 2 M 1/36	
(C 1 2 M 1/36		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		(C 1 2 M 3/00	A
(C 1 2 M 3/00		C 1 2 R 1:91)	
C 1 2 R 1:91)		C 1 2 N 5/00	E

(72) 発明者 田谷 正仁
大阪府豊中市宝山町10-5

F ターム (参考) 4B029 AA02 BB11 CC02 CC08 DA01
DF05 DF06 DG06 DG08
4B065 AA90X AC20 BC11 BC18
BC41 BD14 BD45
5B057 AA10 BA11 BA24 CC03 CE11
CH11 DA08 DA13 DC31